



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADEMICO AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO – PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS:

**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL Y
EL ENDOSPERMO LÍQUIDO DE COCO EN LA SUPERVIVENCIA Y
PROLIFERACIÓN DE CALLOS EMBRIOGENICOS
DE AGUAJE (*Mauritia flexuosa* l.f.)**

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE :
INGENIERO AGRONOMO**

PRESENTADO POR:

Bach: MITZI ANGELA MELÉNDEZ PÉREZ

**TARAPOTO – PERÚ
2012**

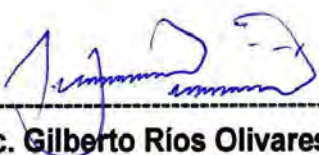
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE AGRONOMIA
AREA DE BIOLOGIA

TESIS:

**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL Y
EL ENDOSPERMO LÍQUIDO DE COCO EN LA SUPERVIVENCIA Y
PROLIFERACIÓN DE CALLOS EMBRIOGENICOS
DE AGUAJE (*Mauritia flexuosa* l.f.)**


PRESENTADO POR LA BACHILLER:
MITZI ANGELA MELÉNDEZ PÉREZ

MIEMBROS DEL JURADO


Ing. M.Sc. Gilberto Ríos Olivares
Presidente



Ing. María Emilia Ruiz Sánchez
Secretaria


Ing. Jorge Pelaéz Rivera
Miembro


Ing. M.Sc. César E. Chappa Santa María.
Asesor

DEDICATORIA

*Con el más profundo respeto, amor y gratitud
a mis padres Clemencia y Fidel, por darme la
vida , por la formación moral e intelectual y
por el incentivo incondicional que me permitió
llegar hasta acá.*



*A mis hermanos, Liria y Carlos gracias por
su compañía a lo largo de estos años ,por el
cariño y momentos tan gratificantes que
compartimos juntos.*

*A mi abuelita Julia Victoria, una persona
muy especial e importante en mi vida ,
gracias por creer en mí ,por la paciencia
y el amor de cada día.*

AGRADECIMIENTO

- ✓ A INCAGRO (Innovación y Competividad para el Agro Peruano), por el apoyo financiero para el desarrollo de esta tesis por intermedio del convenio INIBICO – INCAGRO.
- ✓ Al Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales (INIBICO) , a través del Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales donde se desarrolló la presente tesis.
- ✓ Al Ing. M.Sc. César E.Chappa Santa María, por el asesoramiento del presente trabajo de investigación por las facilidades brindadas aportes acertados y redacción del presente trabajo de investigación y por la invaluable amistad.
- ✓ Al Blgo. Marco A. León Martínez y al Ing. Henri Delgado Haya, Investigadores de INIBICO.
- ✓ A todas aquellas personas que de alguna u otra manera me brindaron su amistad y apoyo.

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

I.INTRODUCCION 1

II.OBJETIVOS 3

III.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

3.1. Generalidades 4

3.2. Características del cultivo 7

3.2.1. Origen y distribución 7

3.2.2. Clasificación botánica del aguaje 9

3.2.3. Morfología general 10

3.2.4. Variedades 12

3.2.5. Rendimiento 12

3.2.6. Cultivo y propagación 12

3.2.7. Biología floral 13

3.2.8. Sexo 13

3.2.9. Germinación 13

3.2.10. Propagación 14

3.2.11. Variabilidad 14

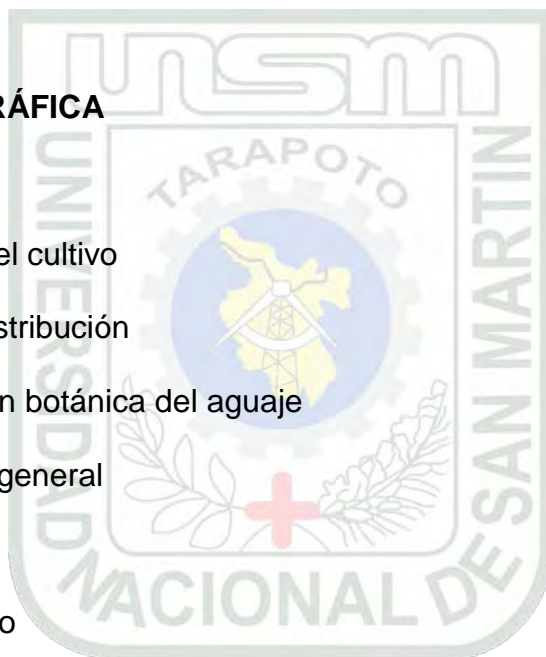
3.2.12. Ecología 15

3.2.13. Proliferación 16

3.2.14. Usos 16

3.2.15. Plagas y enfermedades 17

3.3. Cultivo de tejidos vegetales 17



3.3.1. Medios de cultivo	17
3.3.2. Técnicas de cultivo	19
3.3.3. Regeneración de plantas (embriogénesis y organogénesis)	20
3.4. Características de las plantas invitro	23
3.4.1. Embriogénesis somática	24
3.4.2. Inducción del callo embriogénético	25
3.4.3. Medios de cultivo	26
3.4.4. Medios nutritivos para cultivo invitro de plantas	28
3.4.5. Hormonas de las plantas	29
IV.MATERIALES Y METODOS	30
4.1. Metodología	30
4.1.1. Ubicación del laboratorio experimental	30
4.1.2.Diseño experimental	31
4.1.3. Componentes en estudio	31
4.1.4. Metodología de trabajo en laboratorio	32
4.1.4.1. Recolección del material vegetal	32
4.1.4.2. Conservación del material vegetal para su transporte	33
4.1.4.3. Lavado y preparado del material vegetal	33
4.1.4.4. Preparación de la solución desinfectante	34
4.1.4.5. Medios de cultivo	35
4.1.4.6. Preparación y desinfección del material vegetal	35
4.1.4.7. Siembra de explantes	36
4.1.4.8. Incubación de explantes	36
4.1.4.9. Lavado y preparado del material vegetal	37
4.1.4.10. Parámetros a evaluar	37

V.RESULTADOS	38
VI.DISCUSIONES	43
VII.CONCLUSIONES	49
VIII.RECOMENDACIONES	50
IX.BIBLIOGRAFÍA	51
RESUMEN	
SUMARY	
ANEXOS	



I.INTRODUCCIÓN

El ámbito de influencia del sub - proyecto es la Amazonía peruana, donde hay de 6 a 8 millones de hectáreas de aguajales, lo que representa un potencial productivo importante, siendo más de 5,000 las familias involucradas en el proceso. Tan solo en Iquitos se consumen hasta 20 toneladas de frutos de aguaje/día.

La clonación de palmeras por la vía de embriogénesis somática ha sido estudiada ampliamente en especies de importancia económica como *Phoenix dactylifera* y *Elaeis guineensis* (Hilae y Techato, 2005; Gabr y Tisserat, 1985), lográndose mediante el escalamiento de los protocolos desarrollados, la producción masiva de hasta 10,000 embriones somáticos por litro de medio de cultivo por mes (Fki *et al.*, 2004).

Recientemente se han realizado trabajos similares en palmeras amazónicas como *Bactris gasipaes* (Almeida y Vieira, 2006), *E. oleracea* (Da Silva *et al.*, 2002) y *Euterpe edulis* (Guerra y Handro, 1998). En palmeras que tienen crecimiento único y no forman brotes laterales la propagación por meristemos no representa una alternativa viable por destruir a la planta madre o donadora del explante y por proveer un solo meristemo apical por planta.

Por esta razón, se han probado diferentes tipos de explante como hojas jóvenes, embriones maduros e inmaduros, raíces e inflorescencia, resultando esta última, una fuente de explante limpia, abundante, accesible y adecuada en palmeras Guerra y Handro (1998).

En aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f), en la búsqueda de un método para clonación de genotipos selectos y la producción de plántulas sexadas, Pezo (2006) y Vela (2007), realizaron trabajos de micro - propagación de plantas hembra e inducción de callo génesis para la producción de semilla no convencional, utilizando raíces (neumatóforos) como fuente de explante, no habiendo logrado, sin embargo, regenerar embrioides o plántulas.

Se requiere, por tanto, realizar más investigación en tipos de reguladores de crecimiento a utilizar y probar nuevas fuentes de explante como las inflorescencias inmaduras, a fin de desarrollar un método para la propagación que garantice la producción masiva de plántulas de aguaje sexado en la Amazonía peruana.

II.OBJETIVOS

2.1.Objetivo General

- Contribuir con el desarrollo de una metodología de propagación clonal in vitro de plántulas sexadas de genotipos selectos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) en la Amazonía Peruana.

2.2.Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo para la multiplicación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.).
- Probar el efecto de reguladores de crecimiento vegetal en la supervivencia y proliferación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.).
- Evaluar el efecto del endospermo líquido de coco en la proliferación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.).

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1. Generalidades

Pierik (1987), define cultivo *in vitro*, y dice que es un término muy genérico que se refiere más bien a la metodología usada que al propio objetivo de ese método. En sentido estricto, *in vitro* quiere decir “dentro de vidrio”, es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes (pero también de células y tejidos animales) dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado. En las siguientes secciones nos referiremos siempre al cultivo *in vitro* aplicado a las plantas, omitiendo otros usos de esa técnica.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo. A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos.

Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. El enorme potencial que posee esta metodología ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado. Ruiz (2003), define al cultivo de tejidos *In Vitro*, en su

acepción amplia como un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, células, tejidos, embriones, etc.) con potencialidad de diferenciación, se cultiva bajo condiciones asépticas, en presencia de un medio de cultivo constituido por macro y micronutrientes, vitaminas y hormonas que se incuban a condiciones ambientales controladas.

Roca y Mroginski (1991), hacen referencia que, el cultivo de tejidos como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Las técnicas de cultivos *In Vitro* han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los eventos de diferenciación celular, si no a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas.

Roca y Miroginski (1991), al igual que otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre cultivada *in vitro* son clones, es decir copias genéticamente iguales entre ellas e idénticas a la madre. En plantas propagadas por semilla la descendencia no es clonal, pues cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la recombinación de genes de ambos progenitores.

Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener el cultivo libre de contaminación microbiana. La propagación clonal o en el mejoramiento genético de plantas. De acuerdo a lo antes descrito, para

lograr el establecimiento de cultivares a condiciones *Invitro* se deben tener consideraciones genéricas acerca de los factores directamente influyentes como:

- **Explante**

Roca y Mroginski (1991), La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

- **Asepsia**

Echenique *et al.* (2004), menciona que es la condición estéril sin contaminación por cualquier tipo de microorganismos. Roca y Mroginski(1991), menciona que la asociación explante – medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos) quienes pueden destruir los cultivos.

- **Medio de cultivo**

Consiste de una solución de sales minerales suplementadas con elementos de mayor a menor concentración, necesarios para el crecimiento total de las plantas, adicionándose a este medio: vitaminas; aminoácidos, carbón activado, agente gelificante, sustancias reguladoras de crecimiento, nutrimentos minerales, otros compuestos.

- **Incubación**

La condición de asepsia en esta área es fundamental, debido a que en este ambiente los cultivos inician su crecimiento, desarrollo y permanecen por periodos de tiempo prolongados.

- **Fenolización**

La fenolización es la oxidación del material vegetal

- **Callogénesis**

Proceso fisiológico que da origen a la formación de callos en una forma desordenada.

- **Callo**

Tejido inicial formado por la división celular del explante, generalmente homogéneo, no diferenciado en tejido organizado.

3.2. Características del cultivo

3.2.1. Origen y distribución

Según Cavalcante (1974), el aguaje una especie nativa amazónica, su origen se encuentra en la región centro occidental, probablemente de las cuencas de los ríos Huallaga, Marañón y Ucayali en el Perú. A su vez se sabe también en la cuenca amazónica, se distribuye en Brasil, Colombia, Ecuador.

Según García (2002), menciona que el aguaje es uno de las plantas más representativas de la Amazonía Peruana, crece silvestre en los pantanos de las zonas inundables y en los vallecitos de quebrada de las zonas de altura. Los ecosistemas donde predomina la planta, son conocidos localmente como “aguajales”. Dentro de la cosmovisión de los pueblos originarios, como es el caso de la etnia Yagua, es considerado “el árbol de la vida” y un símbolo de la inmortalidad. Los Cocama-Cocamilla lo llaman “árbol de pan”, ya que tanto la población como muchas especies de la fauna terrestre y acuática dependen de sus frutos para alimentarse.

Adicionalmente, algunas aves, como loros y guacamayos, usan el tronco de las plantas muertas de aguaje para hacer sus nidos.

3.2.2. Clasificación botánica del aguaje

Cronquist (1998), clasifica botánicamente a la planta de aguaje de la siguiente manera:



División	:Magnoliophyta
Clase	:Liliopsida
Sub-clase	:Arecidae
Orden	:Arecales
Familia	:Arecaceae
Sub-familia	:Calamaoideae
Tribu	:Lepidocaryeae
Género	:Mauritia
Especie	: <i>flexuosa</i> L. f.
Nombre Científico	: Mauritiaflexuosa L.f.
Nombre Común	:“Aguaje” (Perú), l.f “buriti” (Brasil),

3.2.3. Morfología general

Rojas (2000), menciona que la morfología de la planta está constituida por las siguientes partes:

• Estípite:

El estípite solitario, inerme erecto de hasta 40 m, de altura y 30 a 60 cm., de diámetro, con una masa de raíces en la base y con pocas hojas muertas y colgadas. Hojas palmadas de 8 a 20 dispuestas en espiral, vaina abierta con una capa fibrosa, pecíolo de 1.6 a 4 m, de longitud, lamina cerca de 2.5 m, de longitud y 4.5 m, total, separados en cerca de 200 folíolos pendulados que miden de 4 a 5 cm, de ancho.

• Hojas

Costa palmeada de 8-20, dispuestas en espiral, raramente dísticas, vaina abierta claramente visible acompañada con poca capa fibrosa, pecíolo de 1.6 -4 m de longitud, lamina cerca de 2.5 m de longitud y 4.5 m total, separado en cerca de 200 folíolos pendulazos, que miden 4-5 cm de ancho en el centro, con pequeñas espinas en las venas, caquis de 30-100 cm de longitud.

• Flores

Simple, flores estaminadas densamente coronadas en la raquilla de 1.1 cm de longitud anaranjado brillante en la antesis, sépalos de 3.5 – 4.5 cm de longitud. Flores postiladas de 8 mm de longitud, sépalos

de 8 m de longitud con una pequeña abertura en el ápex, pétalos lanceolados.

• **Inflorescencia:**

La inflorescencia es interfoliar, pendulada, pedúnculo de 0.7 a 0.9 m, de longitud, raquis de 1.4 a 2.4 de longitud con vainas bracteales, con 18 a 46 raquillas de 70 a 119 cm, de longitud. Flores simples, flores estaminadas densamente coronados en la raquila de 1.1 cm, de longitud, sépalos de 3.5 a 4.5 cm, de longitud, pétalos lanceolados de 1 a 11 cm, de longitud. Flores pistiladas de 8 mm, de longitud, sépalos de 8 mm, longitud.

• **Fruto**

El fruto es una drupa, oblongos o elipsoides hasta 7 cm, de longitud y 5 cm, de diámetro, el peso varía 40 a 80 g., el epicarpio es escamoso de color pardo a rojo oscuro, el mesocarpio suave, amiláceo y aceitoso, de color amarillo, anaranjado rojizo, generalmente con una semilla.

• **Semilla**

El aguaje tienes semillas de 1-2 por fruto, es subglobosa, sólida y con albumen blanco; constituye el 40-44,5% del fruto.

•Raíce

El aguaje posee un tipo especial de raíces aéreas llamadas neumatóforos, que le permite respirar en condiciones de inundación

3.2.4. Variedades

Tradicionalmente existen 3 tipos de aguaje: Shambo (pulpa carnosa y aceitosa de color naranja roja); Azul shambo (adquiere color azulino al remojarlo en agua caliente para maduración) y Killo aguaje (pulpa agridulce y color amarillo).

3.2.5. Rendimiento

El rendimiento por hectárea es variable: fluctúa entre 1 a 10 según las fuentes de información. Se considera los rendimientos en producción local de 1 TM/ha según fuente de Pro Naturaleza (2005) y en producción regional de 6,5 TM/ha según fuente INIA (2005). Si se cuenta con asistencia técnica en campo y un cuidado del cultivo, se obtiene rendimientos de producción superiores. Una palmera produce una inflorescencia de 724 frutos, lo que sugiere un total de 5792 frutos en la palmera, y por tanto, la producción puede ser estimada en 290 kg de frutos por palmera.

3.2.6. Cultivo y propagación

La propagación del aguaje es por semilla botánica, el periodo de germinación es variado; depende algunas veces del estado y desarrollo fisiológico de la semillas, del substrato o de la humedad y temperatura del vivero. En muchas pruebas realizadas en vivero con

substrato de materia orgánica vegetal, fueron registradas una germinación máxima de 88 % en 60 días y mínimo de 9% en 61 días. Flores (1997) y Villachica (1996), reportan que el 40 % de la germinación ocurre en 82 días.

Es recomendable que las plántulas sean trasladadas a campo definitivo, cuando alcanzan una altura superior a 30cm. El distanciamiento de siembra en plantación puede ser de 6 m x 6m a 8 m x8 m, el rendimiento varía entre 15 a 25 t/ha (Penn, 1999).

3.2.7. Biología floral

Storti (1993), menciona que las inflorescencias femeninas y masculinas son interfoliare y ligeramente semejantes. El periodo de formación de una inflorescencia masculina hasta la producción de flores es de 2 a 3 meses, con floración anual ocurriendo de febrero hasta agosto con pico en abril. Las flores masculinas apenas duran un día y la inflorescencia de 7 a 15 días. Gonzales y Noriega (2005), menciona que en la cuenca del Yanayacu la floración de aguaje es anual, ocurriendo de Enero a Agosto con pico en Abril.

3.2.8. Sexo

Para Rojas (2000), no está bien definido el sistema sexual en esta especie, si es totalmente dioica o no; el único trabajo científico experimental sobre la biología floral fue la de Storti 1993, para quien el aguaje es dioico. Villachica *et al.*(1996), afirma que la planta es dioica, con árboles de flores masculinas y árboles de flores

femeninas, sin características que permitan diferenciar a los individuos machos de las hembras hasta la floración.

3.2.9. Germinación

Rojas (2000), menciona que sobre este tema existen opiniones totalmente divergentes, entre tanto para Villachica *et al.* (1996), la germinación es hipogea, pero para Flores (1997) es epigea. Para López (1968), semillas sembradas en un periodo de 1 a 10 días después de la cosecha tuvieron una germinación del 100% en 75 días que duró el proceso; sembradas en un periodo de 10 a 20 días tuvieron una germinación de 85% en 90 días; sembradas de 20 a 30 días tuvieron una germinación de 55% en 120 días.

3.2.10. Propagación

La forma de propagación es por semilla botánica. Se siembra en almácigos o bolsas, para luego ser trasplantadas al terreno definitiva los 4 o 5 meses de edad cuando tengan un mínimo de 30 cm de altura Catie (1983) cit. por Rojas (2000).

Por su parte Villachica *et. al.* (1996), añade que durante la etapa de vivero el aguaje desarrolla mucho más cuando tiene 70% de sombra. Respecto a la viabilidad de la semilla .Flores (1997), quien señala que es corta, aproximadamente 30 días, la germinación es lenta y epigea y las plantas están listas para el trasplante cuando tiene como mínimo 30 cm, de altura, que se logra 4 a 5 meses después de la siembra.

3.2.11. Variabilidad

Balick (1979), indica en relación a las palmeras, los estudios de variación individual sobre un amplio rango muestran especies sumamente variables; existiendo diferencias en tamaño del fruto, altura del árbol, rendimiento, susceptibilidad a la depredación, edad de la primera cosecha y otros factores, que son de vital importancia

3.2.12. Ecología

Rojas (2000), menciona que el hábitat donde se desarrolla el aguaje es muy variado, que van desde tierras bajas inundadas permanentemente o estacionalmente hasta los terrenos bajos de tierra firme; desde suelos pantanosos hasta fértiles, pasando por suelos arenosos; desde el nivel del mar en la costa Atlántica hasta los 1000 msnm., en la ladera de los Andes por lo que se puede afirmar que el aguaje es una palmera con amplia plasticidad fisiológica.

Kahn *et al.* (1993), afirma que algunas especies de palmeras están muy relacionadas a los ríos, lagunas y áreas inundables; siendo un ejemplo claro de este fenómeno el aguaje, ya que soporta una inundación permanente de su sistema radicular, y crece en suelos no organizados en horizontes que resultan de la materia orgánica poco descompuestas en agua, afirmando que es la más acuática de las palmeras amazónicas y que ha conquistado los pantanos de la Amazonía.

Estas palmeras conforman poblaciones particularmente densas en las depresiones localizadas entre los depósitos aluviales abandonados por los ríos y el agua que fluye de los pantanos de días antes del almaciga miento. Por el contrario, para Villachica *et al.* (1996), la semilla separada de la pulpa debe colocarse inmediatamente en camas de aserrín ya que podrían perder el 50% de poder germinativo en 30 días, la germinación se inicia a los 82 días y alcanza 40% a los 101 días.

3.2.13. Proliferación

Merkle *et al.* (1995), manifiesta que uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente.

El factor más fuerte asociado con la proliferación continua de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo parece ser que el efecto de esta fitohormona no puede ser considerado independiente a la reducción de la concentración de nitrógeno, existiendo una fuerte evidencia de la interacción entre ambos, Ramet *et al.* (1982) cit. por Gómez (1998). Además el nivel de auxina necesario para mantener la embriogénesis repetitiva varía de acuerdo a la especie Merkle *et al.* (1995).

3.2.14. Usos

Cavalcante (1976), menciona que el mayor potencial industrial del aguaje se encuentra en el aceite de sus frutos; se determinó que la pulpa seca puede rendir de 8 a 12 % de aceite comestible de color rojo. De la semilla, con disolventes se puede obtener 4.86 % de un amarillo. Esta palmera tiene múltiples usos, desde la alimentación humana hasta lo industrial. El aguaje por su alto contenido de vitamina A se convierte en el fruto de recurso inigualable para la dieta de niños y madres gestantes, pues ayuda la formación y el mantenimiento de dientes sanos, de tejidos blandos y óseos, de las membranas mucosas de la piel, esta vitamina contribuye en mejorar la visión especialmente ante la luz tenue y también es necesaria durante la reproducción y lactancia. Por el alto contenido de beta – caroteno y de vitamina A, es considerado como el fruto comestible con mayor reservas de estos componentes hasta ahora conocida. Del Castillo *et al.* (2006), menciona que la semilla el 54% del peso total del fruto es utilizada para fabricar botones u otros objetos pequeños como artesanía referidas de gran calidad, los motivos preferidos por los artesanos locales son personajes humanos, animales de la región y hasta nacimientos amazónicos.

3.2.15. Plagas y enfermedades

Pedersen y Balslev (1993), afirman que no han sido registradas plagas de importancia para *Mauritia flexuosa*, ni siquiera en grandes poblaciones mono específicas.

Villachica *et al.* (1996), afirma que debido a que el aguaje no ha sido estudiado debidamente al estado cultivado, no se conocen sus plagas y enfermedades, afirma que se observó *Castnia* sp. Barrenador del raquis de los frutales, detectándose su presencia por los orificios de salida de la larva del lepidóptero a lo largo del raquis; también afirma que en los troncos caídos se encuentran *Rhynchophorus palmarum*.

3.3. Cultivo de tejidos vegetales

3.3.1. Medios de cultivo

Krikorian (1991), menciona que el crecimiento de las células y tejidos cultivadas a nivel *In Vitro*, requieren de compuestos orgánicos e inorgánicos dispuestos en diversas concentraciones de macro y microsales, compuestos carbonados, vitaminas, hormonas, aminoácidos, etc. participando en una forma responsable y activa en el crecimiento de los explantes introducidos a nivel *In Vitro*. Según Cirgebv (1994), la propagación *In Vitro* comprende las siguientes fases:

•FASE 0: Selección y preparación de la planta madre

En esta fase se debe tener en cuenta que la planta a propagar deberá representar a la especie, no debe presentar signos de la enfermedad y se debe seleccionar una modalidad de pre-tratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

•FASE I: Cultivo aséptico y establecimiento

Fase muy importante ya que de ella dependerá que los cultivos que se estén manejando no se contaminen, con lo cual se disminuyen los costos de producción.

• **FASE II: Producción de propágulos adecuados**

En este estado las semillas, callos, raíces, meristemos, etc., entran en desarrollo acelerado ya sea en su desarrollo en sí o en su producción de protocormos o embrioides, después de los cuales se inicia la diferenciación de estas nuevas plántulas.

• **FASE III: Preparación para el crecimiento en el medio ambiente**

Lo que se busca en esta etapa, es lograr que las plántulas ya diferenciadas inicien su enraizamiento y desarrollo con la cual estas plántulas estarán aptas para ser sometidas a la etapa de aclimatación.

• **FASE IV: Aclimatación y transferencia al medio ambiente natural**

Referido a plántulas que van a iniciar un proceso en el cual serán introducidas progresivamente a condiciones de cultivo y/o campo definitivo, es una etapa donde los porcentajes de pérdidas pueden ser elevados, pero que con un manejo adecuado estas plántulas podrán ser acondicionadas para crecer en el medio natural.

- **FASE V: Crecimiento en el campo definitivo**

Las plántulas en esta etapa ya pueden producir hojas y demás órganos, soportando con facilidad los cambios bruscos del ambiente.

3.3.2. Técnicas de cultivo *in vitro*.

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* tenemos:

- ✓ Micropropagación vegetal
- ✓ Regeneración de plantas (embriogénesis y organogénesis)
- ✓ Cultivo de meristemos
- ✓ Cultivo de suspensiones de células vegetales
- ✓ Cultivo de cromoplastos
- ✓ Cultivo de anteras y Cultivo de óvulos y embriones

Krikorian (1991), menciona que el crecimiento de las células y tejidos cultivadas a nivel *In Vitro*, requieren de compuestos orgánicos e inorgánicos dispuestos en diversas concentraciones de macro y micro sales, compuestos carbonados, vitaminas, hormonas, aminoácidos, etc., participando en una forma responsable y activa en el crecimiento de los explantes introducidos a nivel *In Vitro*.

3.3.3. Regeneración de plantas (embriogénesis y organogénesis)

Haberlandt (1902), propuso que todas las células de los vegetales tienen la capacidad de poder formar plantas completas, quiere decir que estas plantas tienen un grado de totipotencialidad.

Litz (1991), menciona que la regeneración directa de plantas (organogénesis) y la regeneración indirecta a partir de callos (embriogénesis somática), se ha utilizado como una alternativa a la propagación de plantas y debido a la diferente fisiología de los vegetales no se ha podido generalizar porque existe muy poca estabilidad genética en el cultivo de los callos (en su forma, estructura y viabilidad.)

Embriogénesis somática.

La Embriogénesis somática comprende la formación de un embrión a partir de una célula, diferente a un gameto o al producto de la unión de gametos, siendo conocida en la naturaleza como una forma de apomixis, la cual recibe el nombre de embrionia adventicia (Merkle *et al*, 1995). Los embriones somáticos formados son: estructuras bipolares con un eje radial apical que no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas completas y normales (Gómez, 1998). Según Boner (1965), dos condiciones tienen que ser satisfechas para que ocurra la embriogénesis:

- Las células especializadas tienen que estar separadas del tejido adyacente, tal que sea una célula simple.
- Las células especializadas tienen que estar rodeadas de un medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para el crecimiento del embrión (Halperin, 1995).

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

1. Inducción de embriones somáticos

Según Parrot(1993), la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica.

Contrariamente a los embriones cigóticos los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente de explante. El empleo de la auxina es la mejor manera de inducir la formación de células embriogénicas desde células somáticas. La inducción de la división celular como una respuesta a esta auxina puede resultar en un callo con crecimiento desorganizado o bien en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión” (Gómez 1998).

2. Desarrollo de los embriones somáticos

El estadio temprano o pre globular de los embriones somáticos son fácilmente reconocidos generalmente por el contenido de citoplasma denso y la ausencia general de vacuolización (Krikorian, 1991). Durante esta fase las auxinas son inhibitorias para el desarrollo de los agregados celulares embriogénicos a embriones (Halperin, 1995).

3. Embriogénesis somática natural e inducida

Estos embriones apomícticos son genéticamente idénticos a la planta madre y a consecuencia de este fenómeno se da perpetuación de las poblaciones clonales a través de la semilla.

4. Proliferación

Uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkleet *al.*,1995). El factor más fuerte asociado con la proliferación continua de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo parece ser que el efecto de esta fitohormona no puede ser considerado independiente a la reducción de la concentración de nitrógeno, existiendo una fuerte evidencia de la interacción entre ambos (Ram et al., 1982/cit. por Gómez R., 1998). Además el nivel de auxina necesario para mantener la embriogénesis repetitiva varía de acuerdo a la especie (Merkleet *al.*,1995).

5. Vitro propagación vegetativa

También llamada micro propagación, es la aplicación más práctica de cultivo de tejidos y uno de los mayores efectos (Torreset *al.*,1998). La micro propagación consiste en cultivadas in vitro pequeños segmentos (tejidos y órganos) llamados explantes.

Porque totipotency celular, estos explantes puede regenerar nuevas plantas. Cultura de explanto es parte de la planta cultivada con el objeto de obtención de nuevas plantas in vitro (Alves, 1999).

6. Métodos de Micro propagación

Existen muchos métodos para realizar el micro propagación como:

- a) El cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares
- b) La organogénesis directa
- c) La organogénesis indirecta
- d) La embriogénesis somática
- e) Los órganos de perennidad
- f) El micro injerto y
- g) El cultivo de embriones, semillas y esporas (Delgado y Rojas 1999).

3.4. Características de las plantas in vitro

No es necesaria la actividad fotosintética durante las primeras etapas de la planta en condiciones *In Vitro*, ya que a la planta se le suministran los elementos básicos para su desarrollo mediante un medio nutritivo, encontrándose así en un estado heterotrófico y pasándose a un estado autotrófico al ser trasplantado al suelo (Hurtado y Merino, 1994).

Algunas veces las plantas cultivadas *In Vitro* no sobreviven al ser trasladadas fuera del frasco hacia un medio ambiente de condiciones más rígoras.

Los principales cambios implican: disminución de la humedad, incremento de la intensidad luminosa, baja disponibilidad de nutrientes y la presencia de patógenos. Las plántulas sacadas de los frascos generalmente van de grandes hasta pequeñas y débiles, y muchas veces estas últimas mueren durante la aclimatación, (Martín y Bobisud, 1997).

3.4.1. Embriogénesis somática

Hace más de 100 años Haberlandt declaró que era posible hacer crecer exitosamente en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian *et al*, 1969), lo cual posteriormente fue conocido como Embriogénesis Somática. Basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden él consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas. Sus experimentos de cultivos con células aisladas de hoja sientan los fundamentos del cultivo *in vitro* en general.

Hace más de 100 años Haberlandt declaró que era posible hacer crecer exitosamente en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian *et al.*, 1982), lo cual posteriormente fue conocido como *Embriogénesis Somática*. Basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden él consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas. Sus

experimentos de cultivos con células aisladas de hoja sientan los fundamentos del cultivo *invitro*. Hace más de 100 años Haberlandt declaró que era posible hacer crecer exitosamente en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian *et al*, 1982), lo cual posteriormente fue conocido como *Embriogénesis Somática*. Basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden él consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas.

3.4.2. Inducción de callo embriogénico

El CA se desarrolla en dos etapas principales: (1) inducción de callos y (2) regeneración de plantas verdes. La primera etapa se da en un medio cuya composición estimula selectivamente la división mitótica de las microsporas. A su vez La producción de callo se divide en las siguientes etapas: (a) inducción; (b) proliferación celular; (c) inducción a la diferenciación; (d) envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado (Lentini *et al.*,1997).

Alrededor del quinto día de cultivo se inicia la segunda división mitótica. A los 20 días de cultivo se forma una masa de tejido amorfo denominada callo, el cual contiene más de 100 células por cada microspora originalmente cultivada. El callo alcanza un tamaño de 2mm alrededor de los 30 a 50 días, dependiendo del genotipo. En esta etapa se considera apropiado iniciar el proceso de regeneración de las plantas (Lentini *et al.*,1997).

Tipos de callos. Callos conformados por tejidos esponjosos con gran cantidad de espacio intercelular, de crecimiento rápido, se les denominan callos “tipo I” o friables, mientras que los compuestos por masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, de crecimiento lento con citoplasma denso se les denominan callos “tipo II” o embriogénicos. Estos últimos son los óptimos por su alta capacidad de diferenciación. Bajo el estereoscopio los callos Embriogénicos se distinguen por ser de aspecto esférico, compacto y brillante, (Krikorian *et al.*, 1982).

3.4.3. Medios de cultivo

Normalmente se utilizan dos medios de cultivo, uno para la inducción de callos a partir del polen inmaduro y otro para la regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos. Los medios de cultivo están constituidos por dos grandes grupos de sustancias. El primer grupo, o medio basal, está formado por nutrientes inorgánicos (macro y micro elementos), hidratos de carbono, vitaminas y, en algunos casos, otros aditivos orgánicos. El segundo grupo de sustancias lo constituyen los reguladores de crecimiento de tipo hormonal. Según Lentini *et al.* (1995), la composición óptima tanto del medio para inducción de callos como el de regeneración de plantas es:

Para el tipo *índica*, sin embargo, según los ensayos de Siva *et al.* (1985), el amonio y el magnesio juegan un papel muy importante en la respuesta de estos, el medio He2 es una modificación del N6, que contiene la mitad de la concentración de amonio, el doble en la cantidad de

KH₂PO₄ y cinco veces más baja concentración de MgSO₄. En CIAT se realizaron modificaciones a dicho medio, incrementando en un 9% la fuente de nitrato, un 2% la de magnesio y en forma general empleando además de boro, zinc y manganeso, otros micronutrientes como molibdeno, cobalto y cobre (Lentini *et al.*, 1995).

La adición de 5 a 10mg/l de nitrato de plata en el medio de inducción reduce notablemente la senescencia de las anteras de arroz tipo *índica* recalcitrantes, estimulando en algunos casos un incremento en la inducción de callos, ya que la plata actúa como inhibidor de la acción del etileno. Las vitaminas del medio N6 satisfacen en apariencia la necesidad que tiene el polen de cofactores enzimáticos, sin embargo en el medio desarrollado por Lentini *et al.*, (1995) se utiliza 2.5mg/l de las vitaminas del medio N6 (Anexo 3) obteniéndose mejores resultados.

Los carbohidratos (azúcares) del medio basal satisfacen las moléculas de carbono como fuente de energía. Comúnmente la sacarosa es utilizada para la inducción de callos en anteras de arroz en concentraciones de 3 a 6%, los estudios realizados por Lentini *et al.*, (1995), mostraron que al reemplazar la sacarosa al 5%, por maltosa al 8% se obtiene un incremento significativo en la inducción de callos de genotipos *índica* recalcitrantes y *japónicos* de secano.

Reguladores de crecimiento: Para el CA, resulta primordial el uso de auxinas y citocininas tales como ANA (ácido naftalenacético), 2,4-

D(ácido 2,4 diclorofenoxiacético), Picloramo y AFA (ácido fenilacético), BAP (6-benzilaminopurina) y Kinetina(6 -furfuriaminopurina).

Para el desarrollo de callos, las auxinas en concentraciones medias y altas, actúan sinérgicamente con las citocininas en concentraciones bajas.

3.4.4. Medios nutritivos para cultivo *in vitro* de plantas

El crecimiento de las células y tejidos cultivados a nivel *In Vitro*, requieren de compuestos orgánicos e inorgánicos dispuestos en diversas concentraciones de macro y micro sales, compuestos carbonados, vitaminas, hormonas, aminoácidos, etc; participando en una forma responsable y activa en el crecimiento de los explantes introducidos (Krikorian, 1991). Aunque una planta verde intacta es autótrofa, las células de sus regiones de crecimiento pueden ser acentualmente heterótrofas y requerir la aplicación de un número de estimulantes orgánicos complejos que, en el caso de planta intacta, generalmente se derivan de las células verdes (Pierik, 1990).

3.4.5. Hormonas de las plantas

. Generalidades

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos (luz, nutrientes, temperatura) e internos (hormonas). Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, los cuales

son producidos en una parte de ella y transferidos a otras, en la cual influyen un proceso específico, mencionado por Hurtado y Merino (1994). Las fitohormonas pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos, se incluyen al etileno, auxinas, giberelinas, citoquininas y el ácido abscísico, cada uno con una estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta cada una de las cuales exhiben propiedades fuertes de regulación de crecimiento en plantas y secciones cortadas de éstas (Gonzales y Raciman, 2003). El efecto de la aplicación exógena de los reguladores de crecimiento sobre el crecimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos está fuertemente influenciado por otros factores como las condiciones ambientales de cultivo, el tipo de explante y el genotipo (Delgado y Rojas, 1999).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Metodología

4.1.1. Ubicación del laboratorio experimental

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto De Investigación Biológica De Las Cordilleras Orientales (INIBICO), ubicadas en el distrito de la banda de Shilcayo, región San Martín cuya ubicación política y geográfica se menciona a continuación.



Foto1: Preparación de medios de cultivo

.Ubicación política

Lugar : INIBICO

Distrito : Banda de Shilcayo

Provincia : San Martín

Departamento : San Martín

4.1.2.Diseño experimental

Por tratarse de una investigación de observación, la comparación de los datos se realizó con la estadística descriptiva y comparativa mediante frecuencias acumuladas, acompañado de grafico de barras y líneas, en la cual cada tratamiento contó con 10 repeticiones, evaluándose la respuestaefecto de los reguladores de crecimiento vegetal y el endospermo líquido de coco en el explante (embriones zigóticos) de aguaje.

Formación de callos

Se realizó una prueba 1 x 1 con 10 repeticiones, evaluándose de esta manera la concentración hormonal, teniéndose como factor (A)= Agua de coco.

Diferenciación y Desarrollo de callos

Se realizó una prueba de 4 x 1 con 10 repeticiones, donde se evaluaron diferentes concentraciones hormonales, teniéndose como factor (A) =2,4 - D y como factor (B) =Agua de coco.

4.1.3. Componentes en estudio

A) Tratamientos a evaluar de 2,4-D

- A0 = 0 ppm
- A1 =25ppm
- A2 =45ppm
- A3 =75ppm

B) Tratamientos a evaluar de Agua de Coco

- B0= 0%
- B1= 5%
- B2 =10%
- B3 =20%

4.1.4. Metodología de trabajo en laboratorio

4.1.4.1. Recolección del material vegetal.

El material vegetal nos sirvió para la proliferación de callos embriogénicos se recolectó del campo, las accesiones que se seleccionaron, fueron accesiones que mantuvieron características sobresalientes a la tolerancia del medio ambiente, las que pudimos observar que tienen mejor vigor.

Para la instalación de cada ensayo se comenzó por realizar la colecta de los frutos inmaduros del aguaje, los frutos colectados fueron realizados en palmeras de aguajes hembras en el quinto estadio, es decir el quinto mes de sucujado. Para realizar la colecta se necesitó una escalera telescópica de aluminio, un machete de filo corto de acero, para poder cortar las ramas con el fruto de aguaje y así poder extraerlas.



Foto 2: Recolectando frutos de Aguaje.

4.1.4.2. Conservación del material vegetal para su transporte

Después de recolectar el material vegetal, procederemos a trasladar en bolsas de papel u en otro material como bandejas que nos facilite el transporte y en un tiempo determinado para evitar la contaminación del medio ambiente desde el lugar de recolección hasta el centro de investigación donde se realizará los ensayos (Laboratorio).



Foto 4: Material vegetal recolectado para el transporte.

4.1.4.3. Lavado y preparado del Material Vegetal.

Para la introducción del material a condiciones *InVitro*, se procedió al lavado de la superficie de los frutos con una escobilla pequeña de dientes suaves dentro de un envase con agua y detergente posteriormente se procedió a enjuagar brevemente con agua de caño seguidamente con agua destilada y luego secamos con papel toalla y dejamos a medio ambiente dentro de laboratorio por unas dos horas.



Foto 6 y 7: Desinfectando material vegetal

4.1.4.4. Preparación de la Solución Desinfectante

La solución que se usó como desinfectante es lejía comercial (Hipoclorito de sodio al 5.25%), para disminuir la concentración de la lejía comercial (LejíaClorox) de 5.25% de NaOCl se utiliza la siguiente fórmula:

$$V1.C1 = V2.C2$$

Dónde:

V1: Volumen inicial

V2: VolumenFinal

C1:Concentración inicial

V2:Concentración final

El volumen inicial (V1 en ml) es el volumen requerido de lejía comercial, la concentración inicial (C1 en porcentaje), es la concentración de hipoclorito de sodio de la lejía comercial (5.25% de NaOCl). El volumen final (V2 en ml), es el volumen de agua destilada requerido.

La concentración final (C2 en ml), es la concentración esperada. Se dispensa la solución desinfectante obtenida en frasco de vidrio, se coloca el material vegetal dentro la solución desinfectante por 20 minutos, se agita la solución desinfectante mas el material vegetal con la finalidad de que la solución cubra el área del material vegetal.

Antes de ingresar a la cámara de flujo laminar se limpiará con algodón y alcohol la superficie del frasco para evitar cualquier tipo de contaminación.

4.1.4.5. Medio de cultivo

Se utilizó el medio de M&S (Murashige y Skook) a concentración total a la cual se le agrego 20 g/l de sucrosa y 3 g/l de gel rite , al cual se le agrego

diferentes concentraciones de (2,4-D), Acido Diclorofenoxiacetico(0ppm,25ppm,45ppm,75ppm) y (CW), Agua de Coco(0%,5%,10%,20%). El medio de Cultivo se dispense en tubos de ensayo de 150x25mm a razón de 12 ml de medio de cultivo por tubo, los cuales fueron cerrados con tapa plástica luego autoclavados a una presión de 15lb por 20 minutos hasta alcanzar una temperatura de 121 °C siendo posteriormente llevados a la cámara de flujo laminar para envolverlos con klingwrap entre la tapa y el tubo de ensayo luego dejándoles enfriar a temperatura ambiente.

4.1.4.6.Preparación y desinfección del material vegetal.

Se seleccionaron las mejores muestras extraídas del lugar de colecta luego se estableció una metodología de control fitosanitario y nutricional. Después de haber seleccionado las mejores muestras se condujo al laboratorio de cultivos de tejidos vegetales de INIBICO, posteriormente a esto, los explantes obtenidos y dirigidos al laboratorio recibieron una previa desinfección externa antes de ingresar a la cámara de flujo laminar, se lavaron los explantes en una solución de detergente comercial a razón de 5g/l de por un intermedio de 15 minutos, una vez culminado el lavado se enjuagaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada.

Luego se acondicionó la cámara de flujo laminar con los equipos y materiales necesarios para el proceso de desinfección del explante, una vez culminada la desinfección se le atribuyó enjuagues con agua

destilada estéril. Posteriormente se procedió a obtener los embriones de los explantes.

4.1.4.7.Siembra de explantes.

Se inoculó los explantes extraídos y desinfectados en tubos de 25x150mm.que contenían los medios de cultivo que se utilizaron para la inducción de callos embriogénicos (M&S (1962) a [] total con Myo - inositol a 100mg/l, Agua de Coco a 20%, sucrosa 30 g/l posteriormente se inoculó en otros medios para la multiplicación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f).

4.1.4.8.Incubación de explantes.

Los implantes fueron incubados a una temperatura promedio de $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ en condiciones de oscuridad.

4.1.4.9.Lavado y preparado del material vegetal

Medios de cultivo y preparación.

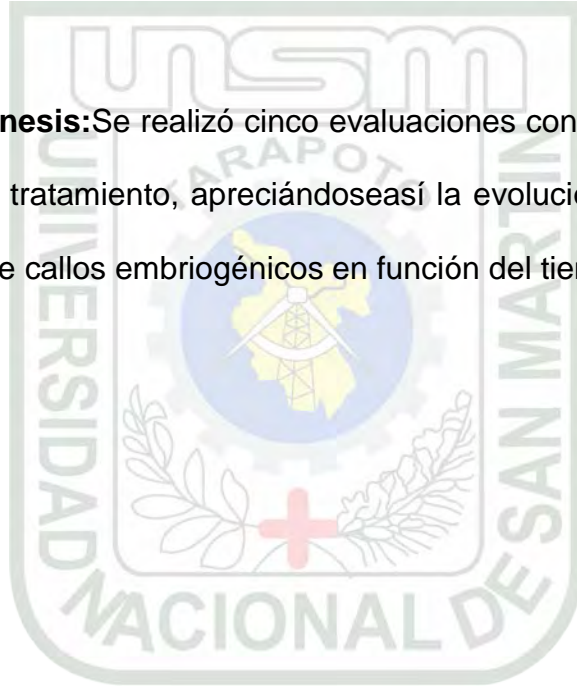
Los medios de cultivo que se prepararon se componen de sales M&S (Murashige&Skoog, 1962) y fitohormonas como 2,4 -D, además de Glucosa 20 g/l, Carbón activado 2g/l, Phitagel, Myo - inositol 100mg/l.

4.1.4.10. Parámetros evaluados

- ✓ **% Contaminación:** Se realizó cinco evaluaciones, evaluándose la presencia de microorganismos (Hongos y Bacterias) a través de la observación directa los seis días después de la siembra y luego cada 15 días, obteniéndose el porcentaje de contaminación por tratamiento.

✓ **%Fenolización:** Se realizó cinco evaluaciones consecutivas cada 15 días por cada tratamiento, observándose el cambio de coloración a marrón claro u oscuro, lo cual nos indicó que la muestra ha sido fenolizada.

✓ **%Callo génesis:** Se realizó cinco evaluaciones consecutivas cada 15 días por cada tratamiento, apreciándose así la evolución del embrión en la formación de callos embriogénicos en función del tiempo.



V. RESULTADOS

5.1. Contaminación en agua de coco

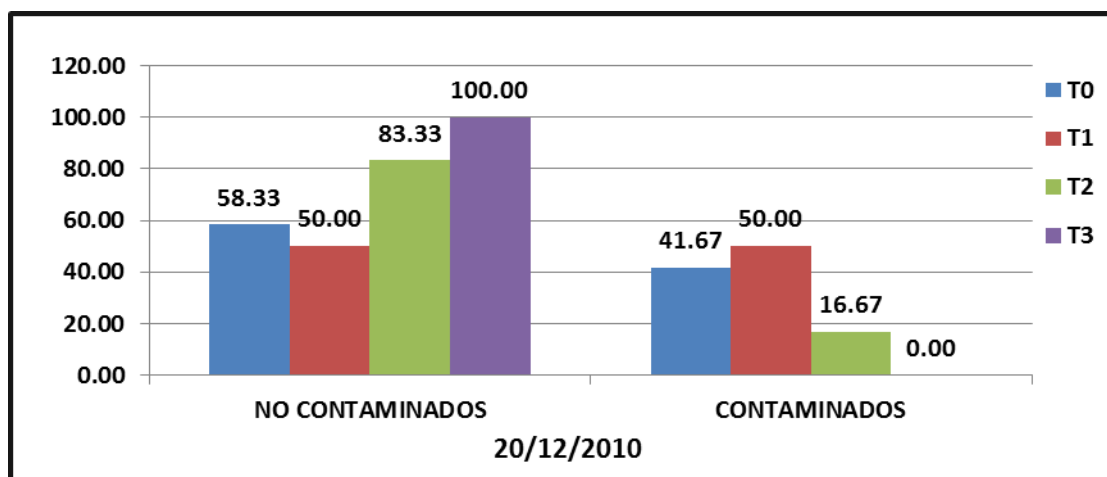


Gráfico 1: Porcentaje de contaminación de las siembras de embriones cigóticos en agua de coco en la quinta evaluación

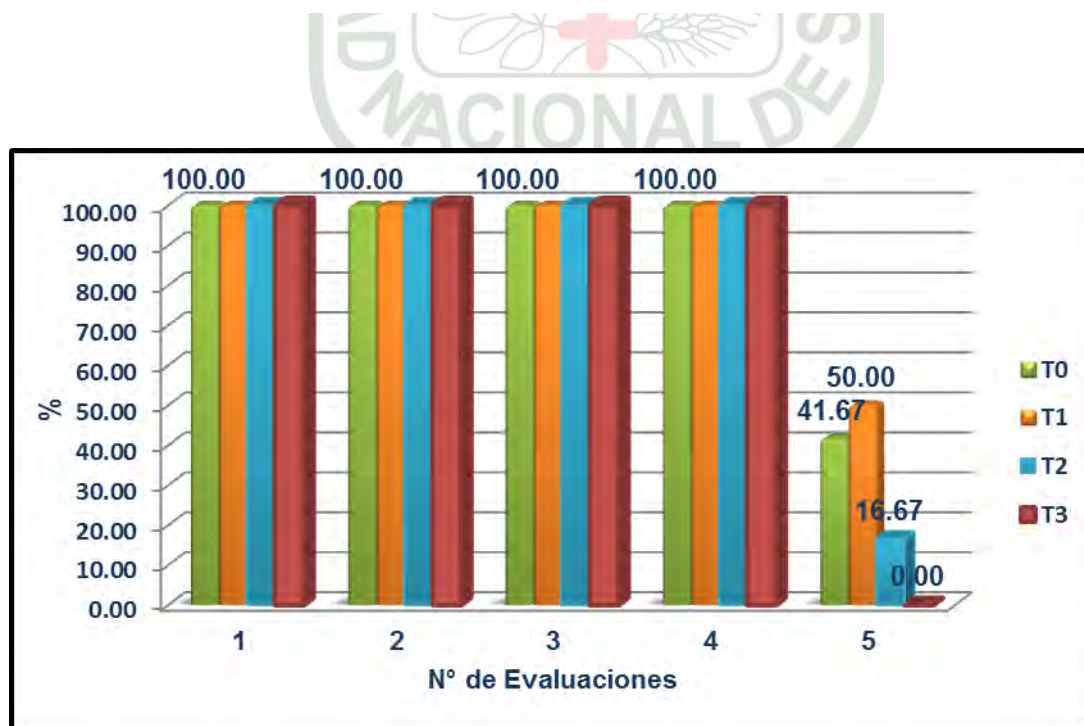


Gráfico 2: Evolución del porcentaje de contaminación durante las siembras de embriones cigóticos de aguaje,

5.2. Contaminación en 2,4 D

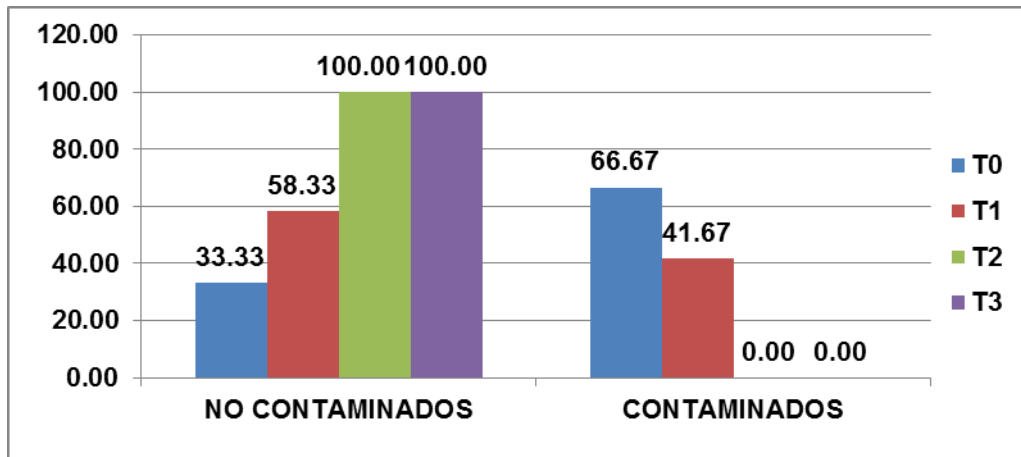


Gráfico 3: Porcentaje de contaminación de las siembras de embriones cigóticos en 2,4 - D en la quinta evaluación

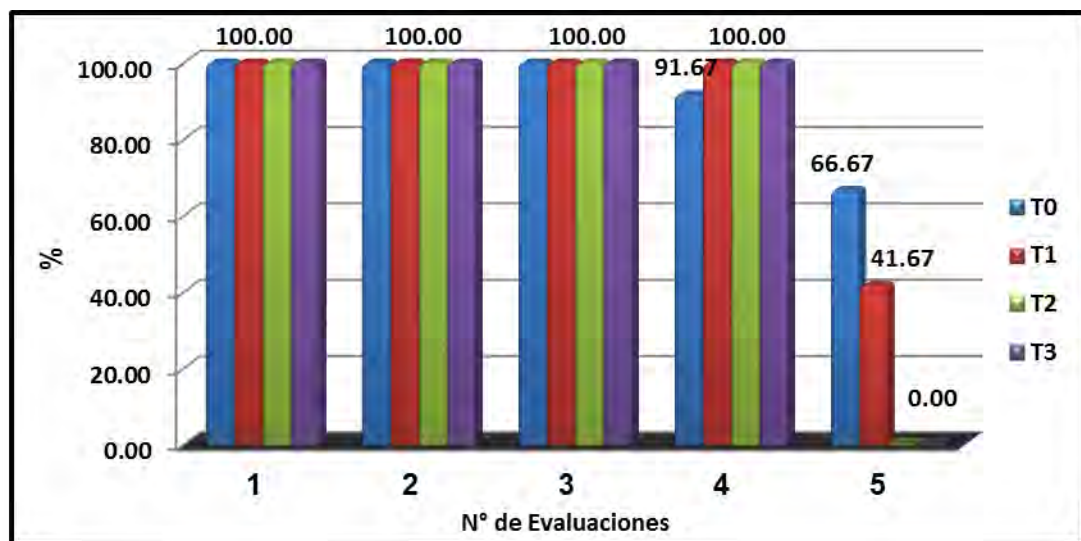


Gráfico 4: Evolución del % de contaminación durante las siembras de embriones cigóticos de aguaje

5.3. Fenolización

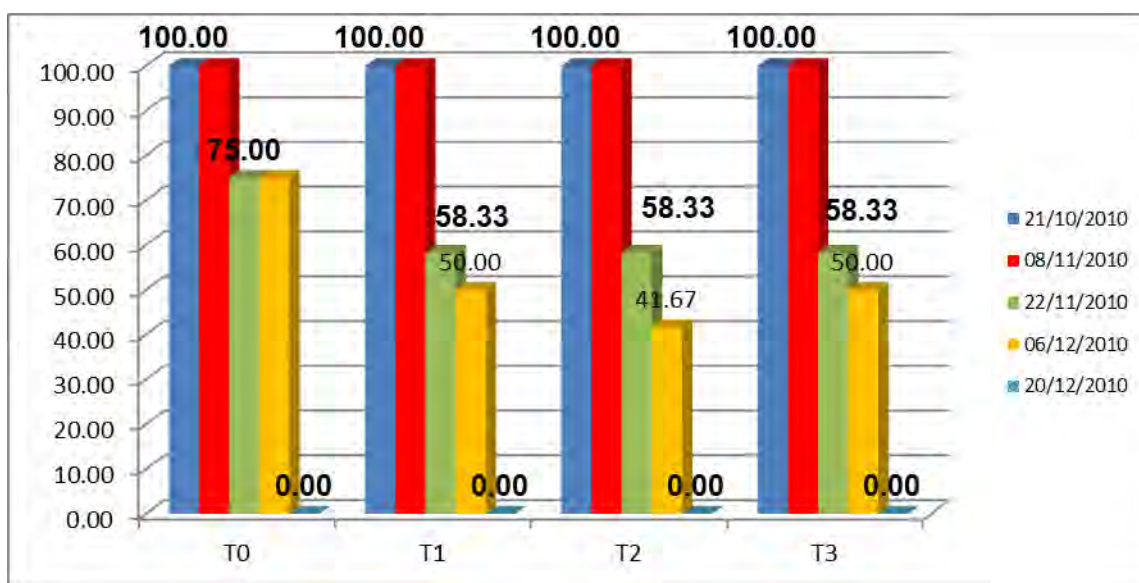


Gráfico 5: Evolución de la fenolización en agua de coco según tratamiento

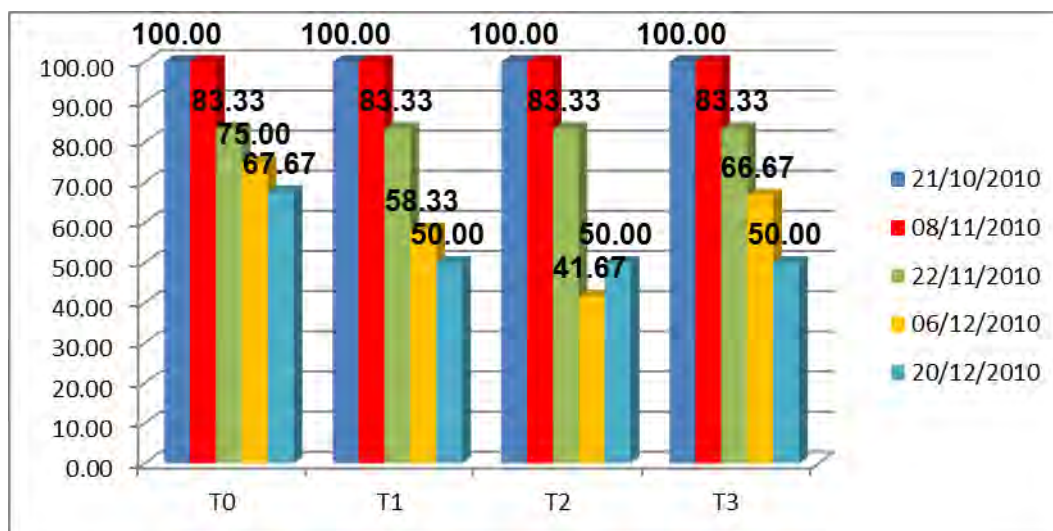


Gráfico 6. Evolución de la fenolización en 2,4 D según tratamiento

5.4. Callogénesis

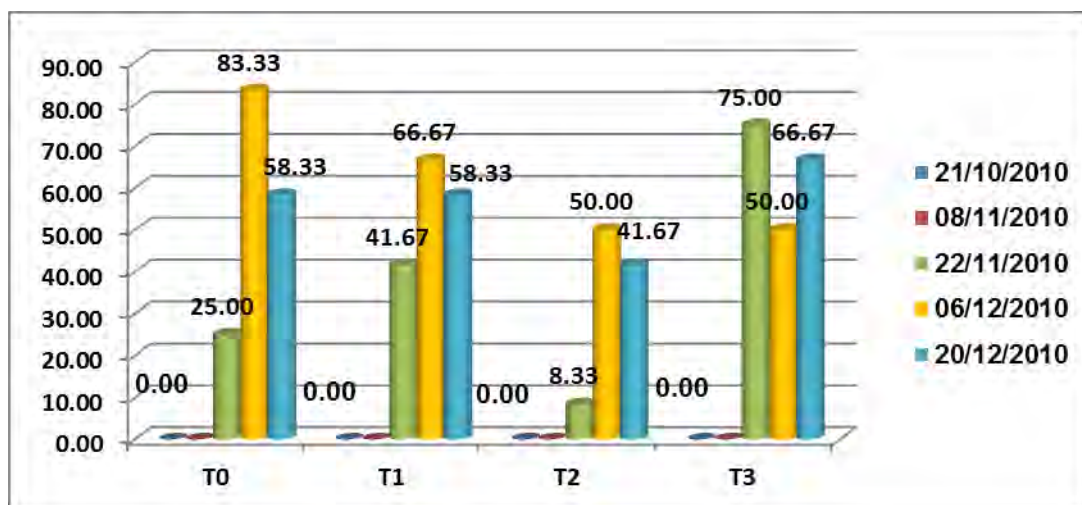


Gráfico 7: Evolución de la formación de callos embriogénicos de aguaje en el agua de coco

Cuadro 1: Promedios, desviación típica, rango y coeficiente de variación de los tratamientos estudiados

Tratamientos	T0	T1	T2	T3
Promedio	55.55	55.55	33.33	63.89
Desviación típica	29.26	12.72	22.05	12.72
Rango	58.33	25.00	45.67	25.00
C.V. (%)	52.67	22.89	60.15	19.90

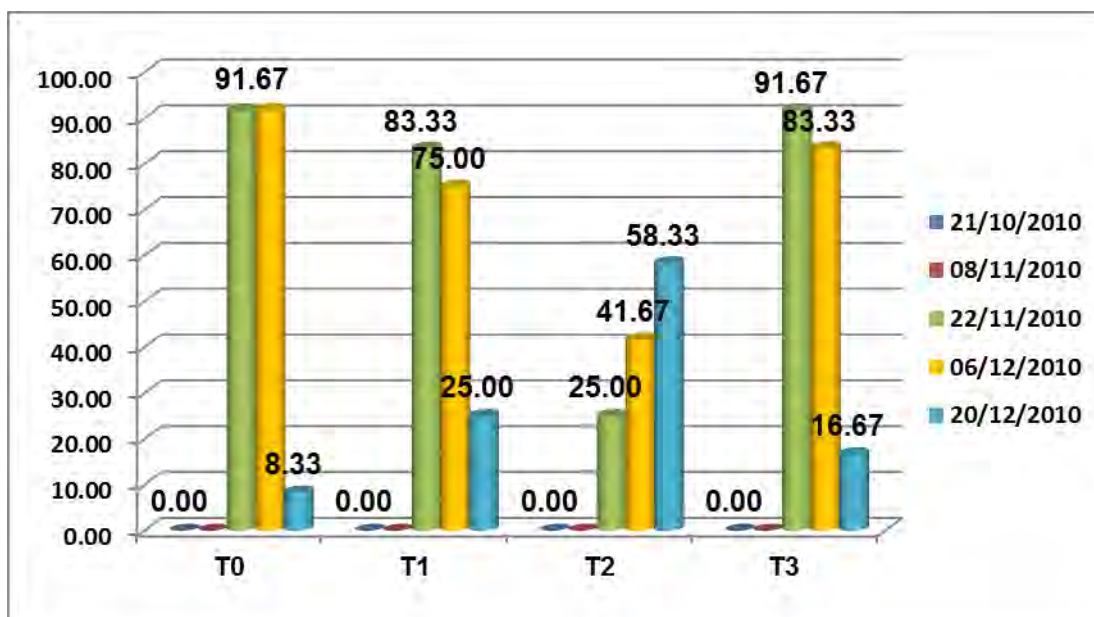


Gráfico 8: Evolución de la formación de callos embriogénicos de aguaje en 2,4-D

VI. DISCUSIONES

6.1. De la contaminación en agua de coco

El gráfico 1 y 2 presentan los resultados referidos al porcentaje de contaminación de las siembras de embriones cigóticos en agua de coco en la quinta evaluación y la evolución del porcentaje de contaminación durante las siembras de embriones cigóticos de aguaje respectivamente.

Respecto al porcentaje de contaminación de las siembras de embriones cigóticos en agua de coco en la quinta evaluación (gráfico 1), se observó que el T3 (20% de agua de coco) no se contaminó, el T2 (10% de agua de coco) arrojó una contaminación 16.67%, el T1 (5% de agua de coco) proyectó un porcentaje de contaminación del orden de 50% y el T0 (testigo) mostró un 41.67% de contaminación.

Este resultado se explica debido a factores relacionados a la manipulación del material estéril y la inducción de los embriones y en la cual los tratamientos testigo (T0) y el tratamiento con 5% de agua de coco (T1) fueron los más susceptibles a la contaminación por microorganismos. Roca y Mroginski (1991), en un estudio para el porcentaje de contaminación en la introducción in vitro de meristemos florales de *Mauritia flexuosa* L. manifiestan que para evitar la contaminación con microorganismo es un aspecto a tener en cuenta para el éxito, no solamente de los cultivos, sino en su ulterior incubación y manipulación. Los mismos autores corroboran lo manifestado en un estudio realizado en cuanto a 2 pruebas de tratamientos de desinfección en contaminación de embriones y Leifert *et al.* (1991), manifiesta que si la

esterilización inicial de la superficie del explante es ineficiente, hongos, levaduras y bacterias pueden ser introducidas en el cultivo in vitro con el material vegetal.

Por otro lado, la evolución de la contaminación durante las siembras de embriones cigóticos de aguaje (gráfico 2), determinó que hasta la cuarta evaluación ningún tratamiento sufrió contaminación alguna. Sin embargo es en la quinta evaluación donde se observó que los tratamientos testigo (T0) y el tratamiento con 5% de agua de coco (T1) fueron los más susceptibles a la contaminación por microorganismos, lo que se corrobora en los resultados del gráfico 1. Esto se debió a que la manipulación del material estéril fue de acción mínima y que a partir de la tercera evaluación la manipulación se realizó dentro de la cámara de flujo laminar y la continua evaluación y manipulaciones posteriores abrieron espacios de contaminación por microorganismos

6.2. De la contaminación en 2,4 D

El gráfico 3 y 4 muestran los resultados referidos al porcentaje de contaminación de las siembras de embriones cigóticos en 2,4 D en la quinta evaluación y la evolución del porcentaje de contaminación durante las siembras de embriones cigóticos de aguaje respectivamente.

Respecto al porcentaje de contaminación de las siembras de embriones cigóticos en 2,4 D en la quinta evaluación (gráfico 3), se observó que el T3 (75 ppm), el T2 (45 ppm) no sufrieron contaminación alguna, sin embargo los tratamientos T1 (25 ppm) y T0 (testigo) arrojaron

porcentajes de contaminación del orden de 41.67% y 66.67% respectivamente.

Este resultado se explica debido a factores relacionados a la manipulación del material estéril y la inducción de los embriones y en la cual los tratamientos testigo (T0) y el tratamiento con 25 ppm de 2,4 D (T1) fueron los más susceptibles a la contaminación por microorganismos; efecto corroborado por Roca y Mroginski, (1991) y Leifert *et al* (1991).

Por otro lado, la evolución de la contaminación durante las siembras de embriones cigóticos de aguaje (gráfico 4), determinó que hasta la cuarta evaluación ningún tratamiento sufrió contaminación alguna. Sin embargo, es en la quinta evaluación donde se observó que los tratamientos testigo (T0) y el tratamiento con 25 ppm de 2,4 D (T1) fueron los más susceptibles a la contaminación por microorganismos, lo que se corrobora en los resultados del gráfico 3.

6.3. De la Fenolización

En el gráfico 5 y 6 se presentan los resultados referidos a la evolución de la fenolización en agua de coco y la evolución de la fenolización en 2,4 D respectivamente, donde los valores de 100% indican que no se fenolizaron.

La inducción de callos se realizó en 06 de octubre 2010 y luego de 32 días después de la inducción y específicamente hasta 2da evaluación realizada el 08/11/10 donde ningún tratamiento sufrió fenolización

alguna. A partir de la 3era evaluación, es decir a los 14 días después de la 2da evaluación todos los tratamientos se fenolizaron, en el orden de 25%; 25% y 100% para el tratamiento T0 (testigo); 41.67%, 50.0% y 100% para el T1 (5% de agua de coco); 41.67%, 58.33% y 100% para el T2 (10% de agua de coco) y 41.67%, 50.0% y 100.0% para el T3 (20% de agua de coco) respectivamente. Es notorio que a la quinta evaluación, es decir a los 42 días de la segunda evaluación todos los tratamientos fenolizaron hasta un 100.0%.

Los resultados obtenidos y sobre todo en las dos primeras evaluaciones se deben a la aplicación de Ac. Ascórbico en una dosis de 100mg/L al medio cultivo, el cual actuó como agente reductor de la fenolización y esto es corroborado por Nahuatet *al.* (2011), quien en su trabajo de investigación Efecto de diferentes antioxidantes en el control de la fenolización del cultivo *in vitro* de orquídeas, concluyó que la oxidación fenólica fue reducida entre 80 y 90% aplicando al medio de cultivo antioxidantes como el ácido ascórbico, evitando el oscurecimiento letal de los explantes los cuales pueden utilizarse para la regeneración de las plantas.

Respecto a la evolución de la fenolización en 2,4 D (gráfico 6), se puede observar resultados similares a los tratamientos en agua de coco. Siendo que todos los tratamientos no fenolizaron hasta la 2da evaluación (32 días después de la inducción) y a partir de la 3er evaluación si se observó que los tratamiento empezaron a fenolizar. Los valores porcentuales para el T0 (testigo) fueron de 16.67%, 25% y 32,73 para la

3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente; el T1 (25 ppm) arrojó promedios porcentuales de 16.67%, 45.67% y 50% para la 3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente; el T2 (45 ppm) con promedios porcentuales de 16.67%, 58.33% y 50.0% para la 3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente y para el T3 (75 ppm) con promedios de 16.67%, 33.33% y 50.0% para la 3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente. Es notorio observar que todos los tratamientos llegaron a fenolizar en la 5ta evaluación hasta un 50%, resultado que diferencia fuertemente a los tratamientos que se inocularon en agua de coco lo que hace que el 2,4 D con la incorporación de ácido ascórbico en 100mg/L fue más efectivo en el control de la fenolización.

6.4. De la callogenesis

Los gráficos 7 y 8 y el cuadro 1, se presentan la evolución de la formación de callos embriogénicos de aguaje en agua de coco, 2,4 Dy los promedios, desviación típica, rango y coeficiente de variación de los tratamientos estudiados respectivamente.

Se observa que la formación de callos embriogénicos se inició a partir de la 3era evaluación (46 días después de la inoculación) con promedios de callo génesis del orden de 55.55%; 55.55%, 33.33% y 63.89% para los tratamientos T0, T1, T2 y T3 respectivamente. Siendo que el Tratamiento T3 (20% de agua de coco) fue el que arrojó el mayor promedio de callo génesis (cuadro 1). Es necesario indicar además que los coeficiente de variación (C.V.) de los tratamientos estuvo relacionado a la desviación estándar con el promedio obtenido y estas fueron del

orden de 52.67%, 22.89%, 60.16% y 19.9% para los tratamientos T0, T1, T2 y T3. Demostrándose que el T3 (20% de agua de coco) fue el que arrojó el menor valor de Coeficiente de variación, lo que lo califica como más estable en la evolución de la formación de callos embriogénicos.

Respecto a la evolución de la formación de callos embriogénicos de aguaje en 2,4 D (gráfico 8), se observa que ningún tratamiento evolucionó en las 2 primeras evaluaciones. El T0 (testigo) evolucionó fuerte y establemente en la 3era y 4ta evaluación con un promedio de 91.67% de callos embriogénicos respectivamente, disminuyendo drásticamente en la 5ta evaluación hasta un 8.33%. El T1 (25 ppm) evolucionó hasta un 83.33%, 75% y 25% en la 3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente. El T2 (45 ppm) es el único que evolucionó crecientemente desde 25%, 41.67% y 58% en la 3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente y el T3 (75 ppm) evolucionó decrecientemente con 91.67%, 83.33% y 16.67% desde la 3era, 4ta y 5ta evaluación respectivamente.

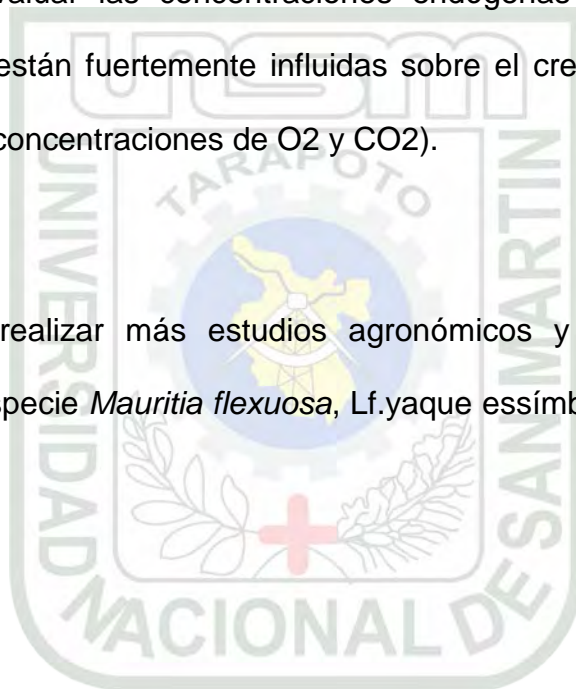
Es evidente que la evolución de la formación de callos embriogénicos se debe al efecto de la auxina 2,4 D y el agua de coco debido a la composición del medio nutritivo y los factores físicos de crecimiento, tal como lo corrobora Stewart *al.* (1964) quien demostró eficacia para inducir la formación de callo, de una combinación de la auxina 2,4 D con la leche de coco en zanahoria. También son importantes para la formación de callos otros muchos factores y reguladores, como por ejemplo: el genotipo, la composición del medio nutritivo, factores físicos

VII. CONCLUSIONES

- 7.1.** Los tratamientos T2 (10% de agua de coco) y T3 (20% de agua de coco) fueron los que presentaron menor contaminación por microorganismos con promedios de 16.67% y 0.0% respectivamente
- 7.2.** Respecto a la contaminación en 2,4 D, los tratamientos T3 (75 ppm), el T2 (45 ppm) no sufrieron contaminación alguna, sin embargo los tratamientos T1 (25 ppm) y T0 (testigo) arrojaron porcentajes de contaminación del orden de 41.67% y 66.67% respectivamente.
- 7.3.** En la fenolización de los tratamientos estudiados se observó a partir de la 3era evaluación (14 días después de la 2da evaluación) donde todos los tratamientos se fenolizaron, en el orden de 25%; 25% y 100% para el tratamiento T0 (testigo); 41.67%, 50.0% y 100% para el T1 (5% de agua de coco); 41.67%, 58.33% y 100% para el T2 (10% de agua de coco) y 41.67%, 50.0% y 100.0% para el T3 (20% de agua de coco) respectivamente y a los 42 días de la segunda evaluación todos los tratamientos fenolizaron hasta un 100.0%.
- 7.4.** La aplicación de ácido ascórbico en una dosis de 100mg/L al medio cultivo actuó como agente reductor de la fenolización.
- 7.5.** T3 (20% de agua de coco) con un coeficiente de variación de 19.9%, seguido del T1 (5% de agua de coco) con 22.89% y quienes alcanzaron promedios de formación de callos de 63.89% y 55.55% los calificó como los tratamientos más estables en la evolución de la formación de callos embriogénicos.

VIII. RECOMENDACIONES

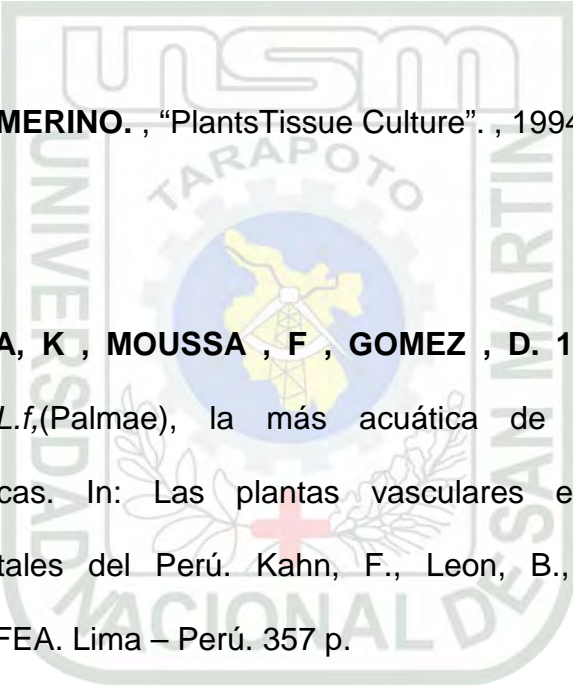
- 8.1. Se recomienda evaluar las concentraciones endógenas de auxinas y citokininas que están fuertemente influidas sobre el crecimiento. (Luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂).
- 8.2. Se recomienda realizar más estudios agronómicos y biológicos en beneficio de la especie *Mauritia flexuosa*, Lf. ya que es símbolo de nuestra amazonia.



IX.BIBLIOGRAFÍA

1. **CRONQUIST, A. 1998.** The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2da Edition. The New York Botanical Garden. New York – USA.
2. **CIRGEBV, 1994.** “Resúmenes del Primer Curso de Propagación In Vitro de Plantas Ornamentales. Centro de Investigación de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal”. Lima – Perú. Pág. 80 – 83.
3. **DELGADO Y ROJAS.1999.** Cultivo de tejidos Vegetales. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque – Peru. 166 – 191, 221 – 254p.
4. **GARCÍA, A., PINTO J, 2002.** “Diagnóstico de la demanda del aguaje en | Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.
5. **GÓMEZ, R. 1998.** Generalidades sobre la Embriogénesis Somática. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva in Vitro de Especies vegetales Instituto Biotecnológico de las plantas. Santa Clara – Cuba.
6. **GONZALES, E. Y R NORIEGA . (2005).** Plan de Manejo Forestal de *Mauritia flexuosa* L.f. “Aguaje”. Reserva Nacional Pacaya

Samiria. Comité de Manejo de Palmeras “20 de enero”.
PRONATURALEZA. Iquitos – Perú. 37 pp.

- 
7. **HURTADO. M y A MERINO.** , “PlantsTissue Culture”. , 1994.México.
8. **KAHN , F , MEJIA, K , MOUSSA , F , GOMEZ , D. 1993 .** *Mauritia flexuosa* L.f.(Palmae), la más acuática de las palmeras amazónicas. In: Las plantas vasculares en las aguas continentales del Perú. Kahn, F., Leon, B., Young, K.R. (comp).IFEA. Lima – Perú. 357 p.
9. **KRIKORIAN, D. 1982.**Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biol. Rev. , 57:151 – 218
10. **KRIKORIAN,A. 1991.** Propagación clonal *in vitro*. In CIAT. Roca, W;Mroginski;eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 91-125.
11. **LEIFERT,C.,CAMOTTA,H.,WRIGHT,S.M.,WAITES,B.,CHEYNE,V.A.Y, WAITES, W.M.**1991.Elimination of *Lactobacillus plantarum*,*Corynebacterium* spp.,*Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from

micropropagated *Hemerocacelis* ,*Choisya* and
Delphinium cultures using antibiotics ,J.Appl.Bact.71:307 – 330
p

- 
12. **LITZ , R.Y R.JARRET.1991.** Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos. "Embriogénesis Somática". Tropical Research and Educación Center. University of Florida – EEUU. 144 p.
13. **MERKLE, S.A; PARROTT, W.A. & FLINN, B.S.** 1995. Morphogenic Aspects of Somatic Embriogenesis, In: in Vitro Embriogenesis Plants.155-203 pp.
14. **MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962.** A revised medium for rapid growth And bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:4734-97.
15. **PADOCH , C. 1992.**Marketing of Non-Timber forest Products in Western Amazonia:General Observations and Research Priorities. In:Advances in Economic Botany 9: 43-50. The New York Botanical Garden.

- 16. PEDERSEN, H.B.YH. BALSLEV. 1993.** Evaluación de aguajales, estudio
Del comportamiento en comunidades asentadas en el
Amazonas.

- 17. PIERIK, R. L. M. 1 987.** Cultivo in Vitro de las plantas superiores.

- 18. RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. C. S.1996.** Manutenção e recuperação
dabiodiversidade do biomacerrado: o uso de plantas
nativas. In: SIMPÓSIO SOBRE
OCERRADO,8.;INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
TROPICAL SAVANNAS 1.Brasília.

- 19. ROCA, W y L. MROGINSKI. 1991.**Cultivo de tejidos en la agricultura.

Funda -mentos y aplicaciones. CIAT. Pp. 499 - 553 –554.

- 20. ROCA, W. 2002.** “El cultivo de meristemas para la conservación

de germoplasma de yuca in vitro”. Guía de estudio. Serie
04SC-05.03. Cali, Colombia – CIAT. 44 p.

21. **ROJAS, R. 2000.** Estado del Conocimiento sobre el Aguaje (*Mauritia flexuosa*) Iquitos – Perú.

22. **RUÍZ ,A. 2003.**“Micropropagación y determinación cromosómica del género *Crotón* productoras de látex”.

23. **STORTI, E.F. 1993.**Biología floral de *Mauritia flexuosa* L.f, na região de Manaus, Am, Brasil. ***Acta amazónica*** 23 (4): 371-381.

24. **SARALUZ NAHUAT DZIB, JOSE LUIS GIORGANA FIGUEROA Y NANCY SANTANA BUZZY.**Efecto de diferentes antioxidantes en el control de la fenolización en el cultivo invitro de orquídeas.Instituto Tecnológico de Mérida,Ave.

25. VILLACHICA, H., URANO, DE C.J.E., HANS, M.C., DÍAZ, S.C.,

ALMANZA, M. 1996. Frutales y hortalizas promisorias de la
Amazonía. Tratado de Cooperación Amazónico. Lima. 367
p.



RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo General: Contribuir con el desarrollo de una metodología de propagación clonal in vitro de plántulas sexadas de genotipos selectos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) en la Amazonía Peruana y como objetivos Específicos: Establecer un protocolo para la multiplicación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.), probar el efecto de reguladores de crecimiento vegetal en la supervivencia y proliferación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) y evaluar el efecto del endospermo líquido de coco en la proliferación de callos embriogénicos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.). Por tratarse de una investigación de observación, la comparación de los datos se realizó con la estadística descriptiva y comparativa mediante frecuencias acumuladas, acompañado de grafico de barras y líneas, en la cual cada tratamiento contó con 10 repeticiones, evaluándose la respuesta efecto de los reguladores de crecimiento vegetal y el endospermo líquido de coco en el explante (embriones cigóticos) de aguaje. Se realizaron pruebas de medios de cultivo con la finalidad de poder multiplicar los callos embriogénicos. Los Componentes en estudio fueron: 2,4-D (A0 = 0 ppm; A1 =25ppm; A2 =45ppm; A3 =75ppm) y Evaluar de Agua De Coco(B0= 0%; B1= 5%; B2 =10%; B3 =20%).

Las conclusiones más relevantes fueron: Los tratamientos T2 (10% de agua de coco) y T3 (20% de agua de coco) fueron los que presentaron menor contaminación por microorganismos con promedios de 16.67% y 0.0% respectivamente, los tratamientos en 2,4 D, T3 (75 ppm), el T2 (45 ppm) no sufrieron contaminación alguna, sin embargo los tratamientos T1 (25 ppm) y T0 (testigo) arrojaron porcentajes de contaminación del orden de 41.67% y 66.67% respectivamente; en la fenolización, se observó a partir de la 3era evaluación (14 días después de la 2da evaluación) donde todos los tratamientos se fenolizaron en el orden de 25%; 25% y 100% para el tratamiento T0 (testigo); 41.67%, 50.0% y 100% para el T1 (5% de agua de coco); 41.67%, 58.33% y 100% para el T2 (10% de agua de coco) y 41.67%, 50.0% y 100.0% para el T3 (20% de agua de coco) respectivamente y a los 42 días de la segunda evaluación todos los tratamientos fenolizaron hasta un 100.0%; el T3 (20% de agua de coco) con un coeficiente de variación de 19.9%, seguido del T1 (5% de agua de coco) con 22.89% y quienes alcanzaron promedios

de formación de callos de 63.89% y 55.55% los calificó como los tratamientos más estables en la evolución de la formación de callos embriogénicos.

Palabras clave: regulador de crecimiento vegetal, fenolización, callo embriogénico.

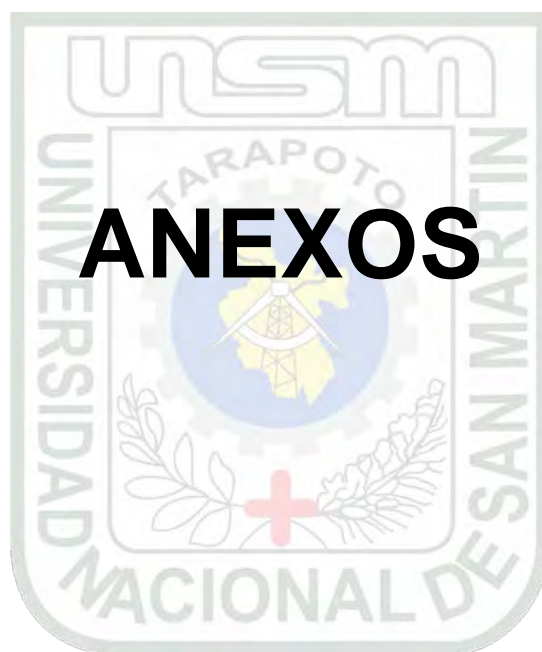


SUMMARY

This research paper aimed General: Contribute to the development of a methodology in vitro clonal propagation of selected genotypes sexed seedlings of palm (*Mauritia flexuosa* Lf) in the Peruvian Amazon and Specific objectives: To establish a protocol for embryogenic callus multiplication palm (*Mauritia flexuosa* Lf), testing the effect of growth regulators plant survival and proliferation of embryogenic calluspalm (*Mauritia flexuosa* Lf) and evaluate the effect of liquid coconut endosperm proliferation of embryogenic calluspalm (*Mauritia flexuosa* Lf).As this is an observational research, comparison of data was performed using descriptive statistics and comparison with cumulative frequencies, together with bar and line graph in which each treatment had 10 replication effect of response regulators plant growth and the liquid endosperm of coconut in the explants(zygotic embryos) aguaje. Were tested for growth media in order to multiply the embryogenic callus. Components studied were: 2,4-D (A0 = 0ppm= 25ppmA1, A2 = 45ppm, A3 =75ppm) and Coconut Water Rate(B0=0%,B1= 5%, B2=10%; B3 =20%).

The most significant findings were: Treatments T2 (10%coconut water) and T3(20%coconut water) were those with less contamination by microorganisms with averages of16.67% and 0.0% respectively in treatments 2,4 D, T3 (75ppm), T2 (45ppm) did not suffer any pollution, but the treatmentsT1(25ppm) and T0(control) showed contamination rates of the order of41.67% and 66.67% respectively in the phenolization was observed from the 3rd assessment (14 days after the 2nd evaluation) where fenolizaron all treatments in the order of 25%, 25% and 100% for treatment T0(control), 41.67%, 50.0% and 100% for T1(5%coconut water), 41.67%, 58.33% and 100% for T2(10%coconut water)and41.67%, 50.0% and 100.0% for T3(20%coconut water) and42 days respectively for the second evaluation fenolizaron all treatments up to 100.0% in Q3 (20% coconut water) with a coefficient of variation of 19.9%, followed by T1(5% water coconut) with 22.89% and those who reached calluses average of 63.89% and 55.55% rated treatments as more stable in the evolution of embryogenic callus formation.

Keywords: plant growth regulator, phenolization, embryogenic callus



ANEXOS

Anexo 1: Composición del medio de cultivo para la proliferación de Callos. En M&S a concentración total, a un volumen de 500ml.

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. final (Medio de cultivo)	
				Cant.	Unid
Macro y micro nutrientes					
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1.65	g/L
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	1.90	g/L
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.44	g/L
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	KH ₂ PO ₄	0.17	g/L
5	Stock E	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₂ .2H ₂ O	0.00025	g/L
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.000025	g/L
		Ioduro de Potasio	KI	0.00083	g/L
		Acido Borico	H ₃ BO ₃	0.0062	g/L
6	Stock F	Sulfato de Manganeso Monohidrato	MnSO ₄ 4H ₂ O	0.0169	g/L
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.370	g/L
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0086	g/L
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.000025	g/L
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.0373	g/L
		Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0278	g/L
Vitaminas					
8		Mio - Inositol		100.000	mg/L
9		Tiamina - HCl		0.400	mg/L
10		Acido Nicotinico		0.500	mg/L
Fuentes de carbono					
11		Sacarosa o sucrosa		20.00	g/L
Fitoreguladores					
12		2,4-D		Varias	
Antioxidantes					
13		Carbon activo		2.00	g/L
Agentes gelantes o solidificantes					
14		Agar Agar		6.00	g/L
Aditivos orgánicos complejos **					
15		Agua de coco		100-200	ml/L
		pH: 5.8			